

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND

DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ **Patentschrift**  
⑯ **DE 39 42 728 C 1**

⑯ Aktenzeichen: P 39 42 728.5-41  
 ⑯ Anmeldetag: 22.12.89  
 ⑯ Offenlegungstag: —  
 ⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 23.5.91

⑯ Int. Cl. 5:

**C 07 K 15/04**

C 12 N 15/63  
 C 07 K 15/28  
 G 01 N 33/53  
 G 01 N 33/68  
 A 61 K 39/02  
 A 61 K 49/00  
 C 12 Q 1/28  
 // (C12P 21/00,  
 C12R 1:19) C07K 3/20

**DE 39 42 728 C 1**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

## ⑯ Patentinhaber:

Mikrogen Molekularbiologische  
Entwicklungs-GmbH, 8000 München, DE

## ⑯ Vertreter:

Keller, G., Dipl.-Biol.Univ. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000  
München

## ⑯ Erfinder:

Fuchs, Renate, Dr., 8024 Delsenhofen, DE; Wilske,  
Bettina, Dr.; Praet-Murisic, Vera, Dr.; Motz, Manfred,  
Dr.; Soutschek, Erwin, Dr., 8000 München, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

The journal of infections diseases, Vol. 153, No. 2,  
Feb. 1986, S. 304-314;  
 Zbl. Bakt. Hyg. A 267, S. 549-558, 1988;  
 Infection and immunity, Vol. 37, No. 11, S. 3637-3645.  
Nov. 1989;

⑯ Immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi*, monoklonale Antikörper, die gegen die immunologisch aktiven Proteine gerichtet sind und die Verwendung dieser Proteine zum Nachweis von Antikörpern in Untersuchungsflüssigkeiten und als Impfstoffe gegen durch *Borrelia*-Stämme hervorgerufene Infektionen

Immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi*, monoklonale Antikörper, die gegen die immunologisch aktiven Proteine gerichtet sind und die Verwendung dieser Proteine zum Nachweis von Antikörpern in Untersuchungsflüssigkeiten und als Impfstoffe gegen durch *Borrelia*-Stämme hervorgerufene Infektionen.  
 Verschiedene immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi* wurden gentechnologisch in Mikroorganismen hergestellt. Dazu wurden die spezifischen DNA-Sequenzen aus einer *B. burgdorferi* Genbank mit geeigneten Suchmethoden selektiert oder direkt durch DNA-Amplifizierung mit ausgewählten Hybriddissoziations-Proben dargestellt und unter die Kontrolle von induzierbaren Promotoren wie etwa dem lac-Promotor gestellt. Durch Beschreibung effizienter Reinigungsverfahren für die exprimierten Antigene konnten die Proteine in geeigneter Weise zur Verfügung gestellt werden. Mit diesen Proteinen können spezifische und sensible diagnostische Testkits hergestellt werden. Durch die gezielte Kombination der immunologisch aktiven Proteine ist eine präzise Diagnose möglich. Im weiteren wurden monoklonale Antikörper erzeugt, die als Reagenzien für den Erregernachweis direkt aus Untersuchungsproben oder nach Kultivierung Verwendung finden. Die *Borrelia burgdorferi*-spezifischen DNA-Sequenzen sind zum direkten Nachweis des Erregers in Patientenproben einsetzbar (z. B. mittels PCR-Reaktion).

**DE 39 42 728 C 1**

DE 39 42 728 C1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die in den Ansprüchen 1 bis 7 angegebenen immunologisch aktiven Proteine v n Borrelia burgdorferi, nach Anspruch 8 dagegen gerichtete monokl nale Antikörper und nach den Ansprüchen 9 bis 17 die Verwendung obiger Proteine.

Die Lyme-Borreliose ist in der Bundesrepublik Deutschland die häufigste v n Zecken übertragene Infektionskrankheit des Menschen. Im Gegensatz zur Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME), die ebenfalls durch Zecken übertragen wird, beschränkt sich die Lyme-Borreliose nicht auf wenige Endemiegebiete, sondern kommt in allen Ländern der BRD vor. Die Durchseuchung des Hauptvektors in Europa, Ixodes ricinus, mit dem Erreger der Lyme-Borreliose, der Spirochäte Borrelia burgdorferi, liegt im süddeutschen Raum bei ca. 20% der Adulten, ca. 10% der Nymphen und bei ca. 1% der Larven (Wilske, B.; Steinhuber, R.; Bermeister, H.; Fingerle, V.; Schierz, G.; Preac-Mursic, V.; Vanek, E.; Lorbeer, B. (1987): Lyme-Borreliose in Süddeutschland. Dtsch. Med. Wschr. 112, 1730-1736). Der Hauptvektor in USA, Ixodes dammini, kann in Hochendemiegebieten bis zu 100% mit Borrelien befallen sein.

B. burgdorferi gehört zur Familie der Spirochäten. Spirochäten sind schraubenförmige Bakterien von 8-30 µm Länge. Sie bestehen aus einer äußeren Hülle, den Endoflagellen im Periplasma und dem Protoplasmazyylinder. Der Protoplasmazyylinder ist ein Komplex aus Cytoplasma, innerer Zellmembran und Peptidoglykan (Barbour, A. G.; Hayes, S. F. (1986): Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50, 381-400). Zu den human-pathogenen Vertretern der Spirochäten gehören neben B. burgdorferi die Rückfallfieberborrelien (z. B. B. recurrentis), der Erreger der Syphilis (*Treponema* (*T.*) *pallidum*) und die Leptospiren. Auf Grund der nahen immunologischen Verwandtschaft der Erreger sind Kreuzreaktionen ein Problem beim serologischen Nachweis von Antikörpern bei Syphilis und Lyme-Borreliose mit bisher verfügbaren Testen.

Eine Infektion mit B. burgdorferi führt zu einem komplexen Krankheitsbild, das man ähnlich wie bei der Syphilis, in drei verschiedene Stadien einteilen kann. Die wichtigsten Manifestationen sind:

## 25 Frühphase:

Stadium I  
Erythema migrans

30 Stadium II  
lymphozytäre Meningoradikulitis Bannwarth (LMR)  
Borrelien-Lymphozytom

## 35 Spätphase:

Stadium III  
Lymearthritis  
Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)  
chronische Borrelien-Encephalomyelitis

40 Seltener klinische Manifestationen sind: Karditis, Myositis, Iritis und Panophthalmitis. Die diaplacentare Übertragung des Erregers ist möglich, jedoch sind bisher nur wenige Fälle einer connatalen Lyme-Borreliose dokumentiert. Die verschiedenen Stadien können einzeln oder kombiniert auftreten. Die Infektion mit B. burgdorferi kann auch subklinisch verlaufen. Epidemiologische Studien an 375 klinisch nachgewiesenen Fällen zeigten einige Besonderheiten in der Alters- und Geschlechtsverteilung bei den verschiedenen klinischen Manifestationen. So fanden sich Patienten mit Erythema migrans am häufigsten in der Altersgruppe der 30 bis 60-jährigen. Neurologische Manifestationen zeigten zwei Altersgipfel: den ersten bei Kindern und Jugendlichen bis 20 Jahren, den zweiten bei 40 bis 70-jährigen. Die Lyme-Arthritis wurde am häufigsten bei 30 bis 60-jährigen beobachtet. Patienten mit ACA waren in keinem Falle jünger als 30 Jahre. Die ACA betrifft deutlich häufiger Frauen als Männer. Die serologische Untersuchung zeigte im Immunfluoreszenztest bei Patienten mit Erythema migrans überwiegend positive IgM-Befunde, bei neurologischen Manifestationen überwiegend positive IgG-Befunde. Bei den Spätmanifestationen ACA und Lyme-Arthritis waren die IgG-Titer regelmäßig erhöht und IgM-Antikörper nur mehr in Ausnahmefällen nachweisbar (Wilske, B.; Schierz, G.; Preac-Mursic, V.; Weber, K.; Pfister, H.-W.; Einhäupl, K. (1984): Serological diagnosis of Erythema migrans disease and related disorders. Infection, 12, 331-337; Herzer, P.; Wilske, B. (1986) Lyme arthritis in Germany. Zbl. Bakt. Hyg. A 263, 268-274).

45 Beruflich stark Zeckenexponierte Personen wie Forstarbeiter weisen eine mit steigendem Alter zunehmende Prävalenz signifikant erhöhter Antikörperspitze gegen B. burgdorferi auf (Münchhoff, P.; Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Schierz, G. (1986): Antibodies against Borrelia burgdorferi in Bavarian forest workers. Zbl. Bakt. Hyg. A 263, 412-419). Für die Diagnostik steht sowohl der Erregernachweis (Hautbiopsien, Liquor, Punktate) ist besonders im Frühstadium (Erythema migrans), bei dem ein Antikörernachweis häufig negativ ist, zu empfehlen. Allerdings ist zur Anzüchtung von B. burgdorferi ein komplexes Nährmedium nötig (Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Schierz, G. (1986): European Borreliae burgdorferi isolated from humans and ticks - culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A 163, 112-118) und die Kultivierung ist daher Speziallabor vorbehalten. Für die Isolierung des Erregers wird außerdem eine Zeit bis zu 5 Wochen benötigt. Die Isolierung von B. burgdorferi gelingt aus Hautproben in 50-70% der Fälle mit Hautmanifestationen und in 3-5% der Fälle mit Neuroborreliose (Preac-Mursic, V., unpubl. Ergebnisse).

DE 39 42 728 C1

Der Antikörpermachweis (IgM, IgG) wird im Serum und bei neurologischen Manifestationen auch aus Liquor durchgeführt. Der serologische Befund ist abhängig vom Stadium der Erkrankung, der Dauer der Symptome und einer evtl. schon erfolgten Antibiotika-Therapie. So ist der Antikörpermachweis mit bisher verfügbaren Testen beim Erythema migrans nur in 20–50% der Fälle erfolgreich, bei neurologischen Manifestationen in 50–90% und bei ACA und Arthritis in 90–100%. Erhöhte IgG-Titer sind diagnostisch nicht immer eindeutig interpretierbar; zum einen kann es sich um eine klinisch manifeste Infektion, zum anderen um einen Durchseuchungstiter handeln. Der wichtigste diagnostische Parameter der Neuroborreliose ist der Nachweis intrathekal gebildeter Antikörper. Dazu wird im Liquor/Serum-Paar der Gehalt an Gesamt-IgG und der Gehalt an Borrelien-spezifischen IgG-Antikörpern mittels ELISA bestimmt und ein spezieller Index berechnet (Wilske, B.; Schierz, G.; Praac-Mursic, V.; v. Busch, K.; Kühbeck, R.; Pfister, H.-W.; Einhäupl, K. (1986): Intrathecal production of specific antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome). *J. Infect. Dis.* 153, 304–313).

Die Therapie der Lyme-Borreliose wird überwiegend mit Penicillin G, Tetracyclinen, Erythromycin oder Cephalosporinen durchgeführt. Die Lyme-Borreliose heilt zwar in den frühen Stadien oft spontan aus, allerdings sind auch dann Spätmanifestationen nicht ausgeschlossen. Daher ist eine Therapie im Frühstadium unerlässlich. Zudem ist eine klinische Heilung nach Antibiotikatherapie bei Spätmanifestationen nur in einem Teil der Fälle zu erzielen (z. B. nur ca. 50% bei Lyme-Arthritis).

Daher sollte die Lyme-Borreliose möglichst frühzeitig diagnostiziert werden. Da (wie bereits erläutert) die Erregerisolierung teuer, zeitaufwendig und zudem auch nicht immer erfolgreich ist, sollten bessere serodiagnostische Tests entwickelt werden. Die bisher benutzten Verfahren (Immunfluoreszenztest (IFT)), indirekter Hämagglutinationstest (IHA), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versagen oftmals in den Frühstadien. Als Antigene werden für diese Tests ganze *B. burgdorferi* Zellen oder Gesamtzell-Ultrasonikate eingesetzt. Die Verwendung unterschiedlicher *B. burgdorferi* Stämme als Antigen führt im Ultrasonikat-ELISA zu unterschiedlichen Testergebnissen, insbesondere wurde festgestellt, daß die Verwendung des Isolats PKo (Praac-Mursic, V.; Wilske, B.; Schierz, G. (1986): European *Borreliae burgdorferi* isolated from humans and ticks-culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl. Baktr. Hyg. A* 183, 112–118) zu signifikant besseren Ergebnissen im IgM-ELISA geführt hat. Die Zellen werden auf Objekträger bzw. Ultrasonikat-Antigenen auf Mikrotiterplatten fixiert, mit Serum oder Liquor inkubiert und die Borrelien-spezifischen Antikörper mit einem zweiten Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Antikörper der entsprechenden Immunglobulinklasse detektiert. Die Reaktion wird dann entweder im Fluoreszenzmikroskop (IFT) oder nach einer Farbreaktion im Photometer (ELISA) ausgewertet. Ein Problem für die Spezifität der Tests sind breite Kreuzreaktionen des Erregers *B. burgdorferi* zu anderen bakteriellen Erregern, insbesondere zu *T. pallidum*, dem Erreger der Syphilis. Da die Testantigene im allgemeinen aus Lysaten des gesamten Erregers bestehen, werden auch Antikörper gegen sog. "common antigens" erfaßt (Hansen, K.; Hidnersson, P.; Pederson, N. S. (1988): Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 338–346). "Common antigens" sind weit verbreitet und in ihrer Sequenz stark konservierte Proteine, d. h. die "Common antigens" von Borrelien, Treponemen, aber auch zahlreicher anderer Bakterien besitzen gemeinsame Epitope. Daneben können falsch positive Reaktionen im IgM-IFT oder IgM-ELISA bei Seren mit Rheumafaktor-Aktivität auftreten. Um die Tests spezifischer zu machen, wird daher beim Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern eine Prä-Absorption der Seren mit einem Treponema-Ultrasonikat und zusätzlich beim Nachweis von IgM-Antikörpern noch eine Absorption mit Rheumafaktorabsorbens durchgeführt.

Von Luft et al., *Infection and Immunity*, Nov. 1989, S. 3637–3645 wurden Zellsäfte des amerikanischen Borrelienstamms "B 31" mit Hilfe der SDS-Gelektrophorese aufgetrennt und gezeigt, daß einige Proteine eine immunologische Aktivität aufweisen. Dieser Veröffentlichung kann jedoch nicht entnommen werden, wie Proteine aus Borrelienstämmen in reiner Form hergestellt werden können. Auch geht aus dieser Arbeit nicht hervor, wie ein sensivierter und vor allem spezifischer Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien in Untersuchungsflüssigkeiten geführt werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi* zur Verfügung zu stellen, die in einem Testkit Verwendung finden, das die oben erwähnten Nachteile nicht aufweist. Weiterhin soll diese Verwendung den schnellen und zuverlässigen Nachweis von gegen *Borrelia burgdorferi* gerichteten Antikörpern ermöglichen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die gegen bestimmte immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi* gerichtet sind. Darüber hinaus sollen gegen immunologisch aktive Proteine zur Verfügung gestellt werden, die sich als Impfstoffe gegen durch Borrelien-Stämme verursachte Infektionen eignen.

Bei der Untersuchung von Patientenserien aus unterschiedlichen Krankheitsstadien der Lyme-Borreliose im Western Blot sowie der Untersuchung von Nicht-Lyme-Borreliose-Patienten (insbesondere Syphilis-Patienten) auf Kreuzreaktivität mit *B. burgdorferi* wurden immunologisch aktive Proteine (*B. burgdorferi*-Antigene) gefunden, die einerseits eine gute Antikörper-Antwort nach Infektion hervorrufen und zum anderen eine geringe Kreuzreaktivität mit nicht *B. burgdorferi*-positiven Seren zeigen (Beispiel 1). Es zeigte sich, daß ein bestimmter Stamm von *B. burgdorferi* mit der laborinternen Kennzeichnung PKo, der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) unter der Nr. 5662 hinterlegt wurde, unter anderem ein immundominantes Protein im Molekulargewichtsbereich um etwa 22 kD (pC-Protein) besitzt. Die Bestimmung des Molekulargewichts der erfundungsgemäßen Proteine erfolgte nach an sich bekannten Methoden insbesondere durch SDS-Gelektrophorese. Es wurde gefunden, daß dieses Protein immundominant für die IgM-Antwort ist. Dieses Protein ist nicht in allen *B. burgdorferi*-Stämmen in gleicher Weise ausgeprägt. Erfundungsgemäß wurde dieses immunologisch aktive Protein (pC-Protein) gentechnologisch hergestellt (Beisp. 3).

Auch andere immunologisch aktive Proteine (Antigene), die sich in besonderer Weise für die Verwendung in

## DE 39 42 728 C1

Testkits eignen, wurden in allgemeinen zugänglichen und kommerziell erhältlichen *Escherichia coli*-Zellen, wie beispielsweise den Stämmen JM 105 oder DH 5 hergestellt. Hierzu wurden die für diese Proteine kodierenden *B. burgdorferi* DNA-Fragmente isoliert und anschließend in effektive Expressionsvektoren eingesetzt (Beisp. 2 und 3).

5 Die Identifizierung und Isolierung der entsprechenden DNA-Fragmente erfolgte nach verschiedenen Methoden. So wurde ein immunologisch aktives Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 41 kD, das im folgenden auch als p41-Protein bezeichnet wird, mittels Polymerase chain reaction (PCR) und spezifischen Primern, deren Sequenzen synthetisch hergestellt wurden, dargestellt (Beisp. 2).

Weiterhin wurde eine Genbank des *B. burgdorferi*-Genoms erstellt, die mittels monoklonaler Antikörper auf die direkte Expression von immunologisch aktiven Proteinen durchsucht wurde.

10 Eine weitere Methode bestand darin, bestimmte ausgewählte immunologisch aktive Proteine (Antigene) aus *B. burgdorferi*-Lysaten zu reinigen und Aminosäuresequenzen dieser Antigene zu ermitteln. Anschließend wurden der Aminosäuresequenz entsprechende Oligodesoxynukleotide synthetisiert und durch Hybridisierung diejenigen Klone der Genbank identifiziert, die für die immunologisch aktiven Proteine kodierende DNA-Sequenzen aufwiesen. Die beiden letztgenannten Methoden werden im Beispiel 3 näher erläutert.

15 Nach Charakterisierung, Sequenzierung und Umklonierung der Gene in entsprechende Expressionsvektoren wurden die Antigene in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend gereinigt. Ein bevorzugtes Reinigungsverfahren wird in Beispiel 4 beschrieben.

20 Die erfindungsgemäß hergestellten immunologisch aktiven Proteine von *Borrelia burgdorferi* (DSM-Nr. 5662) können in Testkits verwendet werden, die einen überraschend sensitiven Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* in verschiedenen Untersuchungsflüssigkeiten zur Verfügung stellen. Ein Vorteil der erfindungsgemäß hergestellten immunologisch aktiven Proteine besteht darin, daß die Präparationen nur aus dem gewünschten Protein und möglicherweise solchen Proteinen bestehen, die auf Degradationserscheinungen und/oder unvollständige Translation zurückzuführen sind. Diese Präparationen enthalten keine solchen *B. burgdorferi*-Proteine, die nicht dem rekombinant erzeugten Protein entsprechen, da sie gentechnologisch hergestellt wurden.

25 Unter dem Begriff "Testkits" wird ein Satz von Testreagentien verstanden, der den Nachweis von bestimmten Antikörpern ermöglicht. Die den Testkits zugrundeliegenden Prinzipien wurden in "Immunoassays for the 80s" (1981) von A. Voller et al., erschienen bei MTP Press Ltd, Falcon House, Lancaster, England beschrieben. Die Testreagentien weisen als wichtigste Komponente das oder die Antigen(e) und gegebenenfalls spezifische, vorzugsweise monoklonale Antikörper auf.

30 Die erfindungsgemäße Verwendung zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* ist dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein immunologisch aktives Protein verwendet wird, das ohne Verunreinigung durch andere Proteine aus dem *Borrelia burgdorferi* Stamm zur Verfügung steht. Dieses immunologisch aktive Protein wirkt als Antigen und reagiert mit den in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen Antikörpern. Vorzugsweise weisen die erfindungsgemäß verwendeten Testkits zwei bis vier immunologisch aktive Proteine auf, die ohne Verunreinigung durch andere Proteine aus *B. burgdorferi* zur Verfügung stehen. Weiterhin enthält das Testkit eine Anzeigekomponente, die das Vorhandensein von Komplexen aus Antigen und Antikörper ermöglicht.

35 Die erfindungsgemäß verwendeten Testkits können auf verschiedenen, an sich bekannten Prinzipien beruhen. Grundsätzlich kann das Antigen eine Markierung tragen, wobei die Markierung aus einem radioaktiven Isotop oder einem Enzym bestehen kann, das eine Farbreaktion katalysiert. Ebenso kann das Antigen an eine feste Unterlage (Mikrotiterplatten oder Kügelchen) gebunden sein und die Anzeigekomponente kann in einem gegen Antikörper gerichteten Antikörper bestehen, der eine Markierung trägt, wobei die Markierung in einem radioaktiven Isotop oder einem Enzym bestehen kann, das eine Farbreaktion katalysiert.

40 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung des sogenannten ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) bevorzugt. Eine Ausführungsform davon wird in Beispiel 5 näher beschrieben. Die Ergebnisse dieses Beispiels zeigen, daß überraschenderweise durch den Einsatz nur eines erfindungsgemäßen Proteins eine sehr hohe Spezifität des Testkits erreicht werden konnte. Darüber hinaus ermöglichen die erfindungsgemäßen Testkits überraschenderweise eine mit dem Krankheitsstadium korrelierte Differenzierung. Der kombinierte Einsatz von mehreren Antigenen in einem Testkit ermöglicht den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* auch in solchen Fällen, in denen sich die Krankheitssymptome noch nicht klinisch manifestiert haben. Ebenso können Infektionen mit *B. burgdorferi* diagnostiziert werden, bei denen der Patient nur eine subklinische Infektion durchläuft. Die Aussage, die durch die erfindungsgemäßen Testkits erhalten werden kann, ist insbesondere in den Fällen bedeutsam, in denen ein Zeckenbiß festgestellt werden konnte, jedoch nicht klar ist, ob eine Infektion mit einem Borrelien-Stamm vorliegt.

45 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der kombinierte Einsatz von mehreren der immunologisch aktiven Proteine bevorzugt. Ganz besondere bevorzugt ist eine Kombination der Proteine p41, pC, p17 und/oder p100. Durch die Verwendung der erfindungsgemäß bevorzugten ELISA-Testkits kann auch eine Differenzierung hinsichtlich der Natur der Antikörper erfolgen. Sollen beispielsweise IgM-Antikörper nachgewiesen werden, kann der sogenannte  $\mu$ -capture-assay angewendet werden; dabei werden gegen IgM-Antikörper gerichtete Antikörper an die feste Phase gebunden. Nach Inkubation der Testplatten mit der zu untersuchenden Flüssigkeit werden die in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen IgM-Antikörper an die feste Phase gebunden. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen kann dann ein immunologisch aktives Protein der vorliegenden Erfindung zugegeben werden. Dieses Antigen wird dann durch ein Anzeigemolekül nachgewiesen. Hierbei kann das Antigen biotinyliert sein, wobei anschließend Avidin zugegeben wird, das kovalent gebundene Peroxidase aufweist. Die Peroxidase katalysiert eine Reaktion, die zur Farbbildung führt.

50 Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß siche monoklonale Antikörper zu dem Komplex Träger/anti-

DE 39 42 728 C1

IgM-Antikörper/nachzuweisender Antikörper/erfindungsgemäßes Antigen gegeben werden, die spezifisch für das Antigen sind und biotinyliert sind. Die Biotinylierung ist beispielsweise in M n kI male Antikörper (1985) Springer Verlag, J. H. Peters et al. beschrieben. Der Nachweis des Komplexes erfolgt darin durch Zugabe von Avidin, an das ein eine Farbreaktion katalysierendes Enzym gekoppelt ist.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß der IgM-Nachweis durch indirekten ELISA geführt wird. Dabei werden die erfindungsgemäßen Antigene auf Mikrotiterplatten gebunden, mit der zu untersuchenden Flüssigkeit inkubiert und nach Waschen erfolgt der Nachweis der Immunkomplexe mittels anti-μ-Konjugat.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Erzeugung von monoklonalen Antikörpern, die gegen die immunologisch aktiven Proteine von *Borrelia burgdorferi* (DSM-Nr. 5662) gerichtet sind. Die Herstellung derartiger monoklonaler Antikörper ist in Beispiel 6 näher erläutert. Verwendet werden können derartige monoklonale Antikörper als Reagenzien für den direkten Erregernachweis. Es können aber auch monoklonale Antikörper an die feste Phase einer Mikrotiterplatte gekoppelt werden. Nach Zugabe der immunologisch aktiven Proteine (Antigene) werden diese durch Antikörper-Antigen-Bindung an die Mikrotiterplatte fixiert. Anschließend wird die Untersuchungsflüssigkeit (bei der es sich beispielsweise um Serum oder Liquor handeln kann) zugegeben. Die in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen Antikörper binden sich dann an das Antigen und lassen sich mit Hilfe einer Anzeigekomponente nachweisen.

Darüber hinaus lassen sich die monoklonalen Antikörper sehr gut zur Reinigung der immunologisch aktiven Proteine (Antigene) verwenden. Vorteilhaft hierbei ist, daß die Reinigung besonders schonend ist. Hierzu werden die monoklonalen Antikörper an eine feste Matrix gebunden. Vorzugsweise liegt diese feste Matrix in Form einer Säule vor. Anschließend werden die partiell vorgereinigten Antigene bei physiologischen Bedingungen mit den an eine feste Matrix gekoppelten Antikörpern versetzt. Nach Waschen des Matrix-Antikörper-Antigen-Komplexes können die Antigene eluiert werden. Üblicherweise werden hierzu hohe Salzkonzentrationen oder Puffer mit einem solchen pH-Wert verwendet, der die Elution ermöglicht.

Weiterhin werden DNA-Sequenzen zur Verfügung gestellt, die der Aminosäuresequenz der immunologisch aktiven Proteine ganz oder zum Teil entsprechen. Diese DNA-Sequenzen können bevorzugt zum Nachweis von *Borrelia*-Stämmen im Untersuchungsmaterial durch Hybridisierung verwendet werden. Dazu wird ein Oligonukleotid hergestellt, das der DNA-Sequenz zum Teil entspricht. Dieses Oligonukleotid wird radioaktiv markiert. Andererseits wird die DNA aus dem Untersuchungsmaterial an einen geeigneten Filter, vorzugsweise Nitrocellulose gebunden und anschließend mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert. Ebenso können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen für die in-situ Hybridisierung zum direkten Nachweis von *B. burgdorferi* in infiziertem Gewebe verwendet werden. Anstelle der chemisch synthetisierten Oligonukleotide können auch entsprechende DNA-Fragmente in Bakterien vermehrt werden und anschließend aus den Vektoren mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten werden. Nach Isolierung dieser DNA-Fragmente können diese radioaktiv markiert werden und wie oben beschrieben zur Hybridisierung verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Proteine (Antigene) von *Borrelia burgdorferi* als Impfstoffe verwendet werden können. Dazu werden die erfindungsgemäßen Antigene in reiner Form dargestellt. Anschließend werden sie einzeln oder in Kombination mit oder ohne ein die Immun-Antwort-stimulierendes Agens der zu impfenden Person appliziert. Hierdurch wird die Bildung von Antikörpern angeregt, die spezifisch gegen *Borrelia burgdorferi*-Stämme sind.

Die erfindungsgemäßen Proteine und monoklonale Antikörper können in verschiedenen Bereichen Verwendung finden. So können die Testkits auch zum Nachweis von *B. burgdorferi*-Infektionen bei Tieren verwendet werden und die Proteine können auch zur Impfung von Tieren, insbesondere von wertvollen Tieren, verwendet werden.

Anhand der folgenden Tabellen, Abbildungen und Beispiele werden die bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung näher erläutert.

## Beispiel 1

## Bestimmung der immunrelevanten und Genus-spezifischen Borrelienproteine

Es wurde nach spezifischen, häufig auftretenden Serum-Antikörpern gesucht, die gegen bestimmte einzelne *B. burgdorferi* Antigene gerichtet sind, möglichst wenig Kreuzreaktivität mit Proteinen verwandter Erreger zeigen und zusätzlich auch eine Korrelation mit den einzelnen Lyme-Borreliose-Krankheitsstadien zulassen.

Die Suche nach häufig erkannten Antigenen erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurde ein Bakterienextrakt von *B. burgdorferi* (Stamm PKo) (Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Schierz, G. (1986): European *Borreliae* *burgdorferi* isolated from humans and ticks – culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A 163, 112–118) nach Pelletieren, Resuspendieren in PBS/NaCl und Ultraschallbehandeln im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, U. K. (1970); Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685).

Die Gels bestanden aus einem Sammelgel mit Taschen für die Proben und einem Trenngel. Die Zusammensetzung der Trenngels war folgendermaßen: 15% Acrylamid, 0,026% Diallyltartardiamid (DATD pro Prozent Acrylamid, 0,15% SDS, 375 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,14 mM Ammoniumperoxydisulphat (AMPER) und 0,035% N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED). AMPER und TEMED dienten dabei als Radikalstarter für die Polymerisation. 2–4 h nach Polymerisation wurde das Sammelgel (3,1% Acrylamid, 0,08% Diallyltartardiamid, 0,1% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 7,0, 3 mM AMPER und 0,05% TEMED) über das Trenngel gegossen und mit 0,1% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 7,0, 3 mM AMPER und 0,05% TEMED über das Trenngel gegossen und mit einem Teflonkamm versehen. Die Anoden- und Kathodenkammer wurde mit identischer Pufferlösung gefüllt: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1% SDS, pH 8,5.

## DE 39 42 728 C1

Es wurden jeweils 20  $\mu$ l Probe in Lysispuffer (3% Saccharose, 2% SDS, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl pH 7,0, Bromphenolblau; 5 min bei 100°C erhitzt) pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur über Nacht mit konstanter Stromstärke von 6 mA für Gele der Größe 20 x 15 cm durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf Nitrocellulose (NC) transferiert.

Für den Proteinstransfer befand sich das Gel mit den anliegenden Nitrocellulose zwischen Whatman 3MM Filterpapier, leitfähigem, 1 cm dicken Schaumstoff und zwei Kohleplatten, die über Platinelektroden den Strom leiteten. Filterpapier, Schaumstoff und Nitrocellulose wurden gut mit Blot-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 8,5) getränkt. Der Transfer fand bei 2 mA/cm<sup>2</sup> für 2 h statt. Freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden für 1 h bei 37°C mit Cohen-Puffer (1 mg/ml Ficoll 400, 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 16 mg/ml Rinderserumalbumin, 0,1% NP 40, 0,05% Bacto-Gelatine in Natriumboratpuffer pH 8,2) (Cohen G. H., Dietzschold, B., Ponca de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L. and Eisenberg, R. J.: *Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibodies*. J. Virol. 49 (1984) 4183-4187) abgesättigt. Der Blot wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit den Patientenserien (Verdünnung 1:100 in 154 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl pH 7,5) unter Schütteln inkubiert.

Nach der Seruminkubation wurde der Blot unter mit TTBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,01% Tween 20) viermal für je 15 min gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit Peroxidasegekoppeltem anti-human-Immunglobulin (Verdünnung 1:1000 in 154 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl pH 7,5) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TTBS wurde der Blot mit 0,5 mg/ml Diaminobenzidin und 0,01% Wasserstoffperoxid in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gefärbt. Die Färbung wurde anschließend mit 1N Schwefelsäure gestoppt, der Blot mit Wasser säurefrei gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet.

Eine Auswahl der Reaktionsmuster verschiedener Seren mit den Western Blot Streifen ist in den Abbildungen 1, 2a und b gezeigt.

Als immundominant erwiesen sich dabei folgende Proteine: p17 (17kDa), pC (22kDa) p41 (41kDa) und p100 (100kDa mit Größenvariation in verschiedenen *B. burgdorferi*-Isolaten). Bis auf p41 sind die biologischen Funktionen dieser Antigene unbekannt; p41 stellt das Flagellin Protein dar (Barbour, A. G. S., Hayes, S. F., Heiland, R. A., Schrumpf, M. E. and Tessier, S. L.: *A Borrelia genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope*. Infect. Immun. 52 (1986) 549-554).

Auf Grund dieser Analysen, die mit einer größeren Anzahl von Patientenserien aus den verschiedenen Krankheitsstadien durchgeführt wurde, ergaben sich Anhaltspunkte, daß mit einem einzigen Antigen nicht immer alle mit *B. burgdorferi* infizierten erfaßt werden. Es zeigte sich, daß vor allem bei Seren mit IgM-Antikörpern (frische Infektion) neben dem Flagellin (p41) noch ein Protein (pC) im 22 kD Bereich besonders häufig erkannt wird. Das gleichzeitige Auftreten beider Antikörper war jedoch nicht zwingend. Es konnten sowohl Seren, die nur Antikörper gegen p41 oder nur Antikörper gegen das pC-Protein besaßen, gefunden werden (Abb. 1 und 2a, Western Blots). Bei der Neuroborreliose ist der Nachweis der intrathekal gebildeten Antikörper im Liquor von großer Bedeutung. IgG-Western Blots bei 12 Liquor-/Serum Paaren von Patienten mit einer lymphozytären Meningoradikulitis Bannwarth zeigten in allen Fällen eine lokale intrathekale Immunantwort gegen p41. Im Späta stadium wurden neben IgG-Antikörpern gegen das Flagellin vor allem Antikörper gegen Proteine im 100 kD Bereich (p100) und im 17 kD Bereich (p17) gefunden, die in den Frühstadien nicht oder nur selten nachweisbar waren. Somit sind Antikörperreaktivitäten gegen die p17- und p100-Proteine gute Marker für das Erreichen des Stadiums (Abb. 2b, Western Blot).

Mit Hilfe dieser vier Antigene kann eine bessere Standardisierung der Tests erreicht werden.

Die Proteine p41, pC und p17 zeigen zudem nur eine geringe Kreuzreaktivität zu anderen Bakterienstämmen, das Protein p100 erwies sich als Genus-spezifisches Protein mit *B. burgdorferi* spezifischen Epitopen. Zusammenfassend sind in Tab. 2 (Reaktivität von Immunseren gegen verschiedene bakterielle Erreger mit Proteinen von *B. burgdorferi*) die Kreuzreaktivitäten von Seren gegen verschiedene verwandte Erreger mit *B. burgdorferi*-Antigenen nach Western Blot Analyse aufgeführt. Bei Versuchen, die vier Proteine (p41, pC, p17, p100) aus *B. burgdorferi* Extrakt zu reinigen, zeigte sich, daß große Mengen an Ausgangsmaterial benötigt werden. Besonders Schwierigkeit bereitete die Reinigung von p100, das im Gesamtextrakt unterrepräsentiert ist. Da die Kultivierung aufwendig und teuer ist, mußte nach gentechnologischen Möglichkeiten zur Herstellung dieser Antigene gesucht werden. Die Analyse von Patientenserien mittels Western Blot hat gezeigt, daß mit einer Kombination von gentechnologisch produzierten p41, pC, p17 sowie p100 als Antigen eine nahezu vollständige Erfassung aller positiven Seren erfolgen kann, und weiterhin eine Korrelation zum Krankheitsstadium gegeben ist.

55

## Beispiel 2

Gentechnologische Produktion von p41 (Flagellin) aus *B. burgdorferi* in *Escherichia coli*

Der kodierende Bereich von p41 wurde mittels DNA-Amplifizierung durch eine "polymerase chain reaction" (PCR) aus einer *B. burgdorferi* (DSM-Nr. 5662 P/Ko2/85) Gesamt-DNA Präparation gewonnen. Die so erhaltene Sequenz wurde anschließend unter die Kontrolle von induzierbaren Promotoren gestellt und nach Transfektion in *E. coli* zur Expression gebracht (Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor).

Hierfür wurden die *B. burgdorferi* Zellen 2 Wochen bei 37°C in 2 l modifiziertem Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) Medium (Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Schierz, G. (1986): *European Borreliae burgdorferi isolated from humans and ticks - culture conditions and antibiotic susceptibility*. Zbl. Bakt. Hyg. A 163, 112-118) kultiviert, bei 6000 rpm pelletiert, in TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl) gewaschen und in

## DE 39 42 728 C1

20 ml Lysozym Puffer (20% Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 Min. bei 37°C wurden die durch die Einwirkung des Lysozyms auf die Zellwand entstehenden Protoplasten durch Zugabe von 1 ml 25% SDS (Natriumdodecylsulfat) lysiert. Nach weiteren 10 min wurden 4 ml einer 5 M NaCl Lösung hinzugegeben. Protein wurde durch Zugabe von einem gleichen Volumen TE-gesättigten (TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA) Phenol denaturiert. Durch Zentrifugation bei 4°C und 6500 rpm für 5 min erfolgte die Separation der Phasen. Die obere DNA-haltige, wässrige Phase wurde mit einer Pipette mit weiter Öffnung (zur Vermeidung von Scherkräften) vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt und anschließend nochmals mit demselben Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1 : 1 : 0.04) extrahiert. Nach der Separation wurde wiederum die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und die DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol präzipitiert. Nach ca. 5 min wird die als lange, fädige Gebilde ausgefallene DNA durch Aufwickeln an einem Glasstab entfernt und in eine 70%ige Ethanolösung zum Waschen überführt. Die an dem Glasstab durch Adhäsion gebundene DNA wurde anschließend 2 h bei Raumtemperatur gelagert, um ein Abdampfen des Ethanol zu bewirken, und dann in 4 ml TEN-Puffer überführt.

Je 1 µl der so erhaltenen *B. burgdorferi* Gesamt-DNA wurde in fünf 100 µl PCR Ansätzen amplifiziert.

Als spezifische Primer für die Polymerase katalysierte Amplifikation wurden Sequenzen gewählt, die die Information für den translationalen Start sowie das 3'-Ende von p41 (Flagellin) enthielten. Es wurden hierfür die in Abb. 3 gezeigten DNA-Sequenzen verwendet. Die beiden Oligodesoxynukleotide wurden auf einem DNA-Synthesizer 8700 in 1 µmol Säulen synthetisiert, nach der Abspaltung mit Ammoniak durch Ethanol-Füllung grob gereinigt und in je 400 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Je 1 µl dieser Oligodesoxynukleotid-Lösung wurden pro PCR-Ansatz eingesetzt; die Puffer, Nukleotide und die Taq-Polymerase stammten aus einem kommerziell erhältlichen Testkit und wurden auch nach den Testbeschreibungen verwendet. Die Temperaturbedingungen für die einzelnen Zyklen waren:

2 min Denaturierung bei 94°C

2 min Annealing bei 45°C

4 min DNA-Synthese bei 73°C

50 Zyklen wurden durchgeführt.

Die Ansätze aus den PCRs wurden anschließend vereinigt, und die DNA nach Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 0,2 M mit dem 2,5 fachen an Ethanol bei -20°C für 3 h gefällt. Nach der Pelletierung und Waschen in 70% Ethanol wurde die DNA in 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst und nach Zugabe entsprechender Puffer mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI nach den Angaben des Herstellers gespalten.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in einem 1,5% Agarosegel wurde das amplifizierte DNA Fragment (ca. 1000 bp) isoliert und in einen mit BamHI und PstI geschnittenen pUC8 Vektor (Vierira, J.; Messing, J. (1982): The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268) inseriert, wobei 0.25 µg des Vektors, 0.5 µg des p41 Fragments und 2U T4-DNA-Ligase mit Puffer nach Angabe des Herstellers eingesetzt wurden.

Nach Transformation der ligierten DNA Fragmente in den *E. coli* Stamm JM 109 (Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119) und Ausplattieren auf Agar-Platten mit Ampicillin (50 µg/ml) und X-Gal (30 µg/ml) wurden weiße Kolonien in 5 ml L-Broth Medium hochgezogen, und die isolierten Plasmide mittels Restriktionsenzym-Spaltung auf deren Inserts untersucht.

Das *B. burgdorferi* Flagellin-kodierende DNA-Fragment sitzt damit hinter dem induzierbaren lacUV5 Promoter des Vektors im selben Leserahmen wie das von diesem Promotor gestartete lacZα-kodierende Transkript. Dadurch entsteht ein Flagellin, welches an seinem N-Terminus einige pUC8-kodierte Aminosäuren enthält. Dieser Bereich ist nachfolgend aufgeführt:

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC ATC ATG ATT

MET THR MET ILE THR ASN SER ARG GLY SER ILE MET ILE

pUC8

p41

Von positiven *E. coli* Klonen (z. B. pUC8 ly13) die Vektor mit DNA Insert in der erwarteten Länge (1000 bp) enthielten wurden wiederum Flüssigkulturen angelegt, und die Transkription von dem lac-Promotor des Plasmids durch 3ständige Induktion mit 1 mM IPTG bei 37°C und Schütteln induziert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden dann kurz pelletiert, die Bakterien mit "boiling mix" (3% Saccharose, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 2% Bromphenolblau) bei 100°C für 10 min lysiert, und die Proteine mittels 17.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anfärben der Proteine durch Coomassie brilliant Blau zeigte sich bei den Zellen mit Plasmid-Insert eine neue, zusätzliche Bands bei ca. 41 kD, die der erwarteten Größe des Flagellins entspricht. Eine spezifische Reaktion dieses rekombinanten Antigens mit einem Serum eines Lyme-Borreliose Patienten sowie mit einem monoklonalen Antikörper gegen *B. burgdorferi* p41 Flagellin ist in dem in Abb. 4 gezeigten Immunoblot nachgewiesen.

Ebenso wie pUC8 ist auch jedes andere induzierbare Plasmid, das ein Transkript in demselben Leserahmen startet, für die Produktion von p41 geeignet. Durch Spaltung des p41-kodierenden Bereichs am Translationsstart mit BspHII (Tc ATG A) und PstI (am 3'-Ende) und Einsetzen des Fragments in die NcoI-Stelle (CC ATG G) und PstI-Stelle eines sogenannten ATG-Vektors ist auch die Expression eines authentischen p41 möglich, welches

DE 39 42 728 C1

keinerlei Fremdamin säuren anfusioniert hat.  
Für die nachfolgend aufgezeigten Verfahren wurde der Klon pUC8ly17 verwendet.

### Beispiel 3

5 Produktion von pC und p100 in *E. coli* aus *B. burgdorferi* Genbanken

Zur Bereitstellung *B. burgdorferi* spezifischer DNA-Sequenzen wurde in *E. coli* eine chromosomal Gen-Bank angelegt. Mit Hilfe geeigneter Methoden wie Immuno-Screening oder Hybridisierung mit ausgewählten Oligonukleotiden konnten in dieser Gen-Bank *E. coli* Klone identifiziert werden, welche entsprechende *B. burgdorferi* spezifische DNA-Sequenzen enthielten. Nach Restriktions-Enzym-Analyse wurde eine Restriktions-Enzym-Karte erstellt. Diese konnte verwendet werden, um die gesuchten DNA-Sequenzen gezielt in Expressions-Vektoren zu überführen bzw. deren Sequenzierung durchzuführen. Dabei wurde im Einzelnen wie folgt vorgegangen:

15 Zur Isolierung *B. burgdorferi* (DSM-Nr. 5662) DNA (chromosomale DNA wie Plasmid DNA) wurden die Zellen wie unter Beispiel 2 beschrieben kultiviert. Nach Zentrifugation bei 12 000 upm für 20 Minuten wurden die Zellen gewaschen und in SET Puffer (20% Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 50 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe von 15 mg/5 ml Lysozym für 20 Minuten wurde die Zellwand partiell gespalten. Anschließend wurden die protoplastisierten Zellen durch Zugabe von SDS (n-Dodecylsulfat Natriumsalz) Endkonzentration 1% lysiert. Nach 20 Minuten bei 37°C wurde Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) für zweimal 1 Stunde zugesetzt und die DNA enthaltene Lösung auf 100 mM NaCl mit TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl) eingestellt. Es erfolgten eine Phenol-Extraktion und zwei weitere Phenol/Chloroform/iso-Amylalkohol-Extraktionen (Phenol : Chloroform im Verhältnis 1 : 1; Chloroform : iso-Amylalkohol im Verhältnis 24 : 1). Der so extrahierte Überstand wurde mit 2,5 vol. 95% Ethanol versetzt und bei -20°C die DNA präzipitiert. Durch Aufwickeln auf einen Glassstab konnte die fälig ausgefallene DNA gewonnen und in 70% Ethanol gewaschen werden. Nach kurzer Trocknung im Exsiccator wurde die DNA in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA) der RNase (20 µg/ml) enthielt aufgenommen. Die so präparierte DNA wurde für die weiteren Schritte verwendet.

die weiteren Schritte verwendet.

B. burgdorferi DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Sau 3A nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Durch die Wahl geeigneter Enzym-Verdünnungen bzw. Einwirkzeit des Enzyms auf DNA wurde eine partielle Spaltung derselben erreicht. So erhaltene partiell gespaltene DNA wurde mit, BamH I-restringierter und durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierter Vektor DNA (pUC18 oder andere geeignete Vektor DNA) ligiert. Dazu wurde T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Pro Transformationsansatz wurden 0,2–0,5 µg/µl Gesamt DNA eingesetzt. *E. coli* JM 109 (oder andere geeignete *E. coli* Stämme) wurden nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, D. (1985): Techniques of Transformation of *Escherichia coli*, S. 109–135. In: D. M. Glover (Hrsg.) DNA cloning, Vol. I. A practical approach. IRL Press, Oxford) bzw. nach Maniatis et al. (Maniatis, T. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) mit der ligierten DNA transformiert. Rekombinante *E. coli* Klone wurden auf LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, welches 100 µg/ml Ampicillin (oder ein anderes geeignetes Antibiotikum) enthielt, selektioniert und kultiviert. Das Koloniemuster wurde identisch auf LB-Platten übertragen und Kolonieabdrücke auf Nitrocellulose erstellt. Die Zellen dieser Kolonieabdrücke wurden je nach angewandtem Screening Verfahren auf dem Filter unterschiedlich lysiert. Bei Verwendung von mono- bzw. polyclonalen Seren (Immunoscreening) zur Detektion *B. burgdorferi* spezifischer Genprodukte, die durch die einrekonbiinierte DNA, induziert werden, wurden die Zellen 15 min über gesättigtem Chloroform-Dampf lysiert. Nach Absättigung des so behandelten Filters mit einer Magermilch-Lösung für 2 Stunden wurden Filter über Nacht mit den verschiedenen Seren inkubiert, mehrmals mit TTBS-Puffer gewaschen (s. o.) und 1. Stunden mit dem zweiten Peroxidase konjugierten Antikörper inkubiert. Erneutes Waschen mit TTBS-Puffer diente zur Reduzierung unspezifisch gebundener Peroxidase konjugierter Antikörper. Durch enzymatische Umsetzung der Substrate Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ein unlösliches braunes Pigment konnte positive, d. h. *B. burgdorferi* Antigen produzierende *E. coli* Klone erkannt werden. Die so erkannten positiven *E. coli* Klone wurden von der Ausgangs-Platte angeimpft und analysiert. Bei Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden zur Hybridisierung und damit zur Detektion spezifischer *B. burgdorferi* Antigen Sequenzen (Screening durch Hybridisierung) wurden die Zellen auf dem Nitrocellulose Filter alkalisch lysiert (durch Befeuern der Filter für 5 Minuten mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Nach Neutralisierung (durch Befeuern der Filter für 5 Minuten in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0) wurden die Filter mit der denaturierten DNA mit 2 × SSPE (20 × SSPE: 3,6 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0) benetzt und getrocknet. Durch Backen der Filter für 2 Stunden bei 80°C wurde die DNA fixiert. Die so behandelten Filter wurden dann für die Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung radioaktiver (<sup>32</sup>P) bzw. nicht radioaktiver (z. B. Digoxigenin) Nachweismethoden. Hierbei wurde nach bekannten (Maniatis, T. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor) bzw. vom Hersteller empfohlenen Markierungsmethoden (<sup>32</sup>P-Markierung mit <sup>32</sup>P-gamma-ATP und Kinasereaktion bzw. Digoxigenin-Markierung mit Dig-11-UTP und terminaler Transferase-Reaktion) verfahren. Von positiven *E. coli* Klonen wurde eine Restriktions-Enzym-Analyse erstellt und mit dieser Information eine Expression der Antigen kodierenden DNA-Sequenzen in geeigneten Vektoren bzw. deren Sequenzierung durchgeführt.

Als Hybridisierungsproben wurden zu Beginn synthetische Oligodesoxynukleotide eingesetzt, deren Sequenzen anhand von p100 und pC Aminosäuren-Sequenzen ausgewählt wurden.

Aus *Lysaten* von *N. burgdorferi* wurden die beiden Proteine durch Extraktion mit n-Octyl  $\beta$ -D-Thioglycopyranose (OCT) und anschließende Anwendung auf eine 10%ige Ammoniumsulfat-Fällung (10% SAT) isoliert.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:  
Aus Lysaten v. *n. B. burgdorferi* wurden die beiden Proteine durch Extraktion mit n-Octyl  $\beta$ -D-Thioglucopyra-

## DE 39 42 728 C1

nosid partiell aufgereinigt und weiter durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Antigene durch Western Blotting auf eine Glasfibernatrix übertragen und die entsprechenden Stücke mit den *B. burgdorferi*-Proteinen ausgeschnitten. p100 wurde dann N-terminal ansequenziert und die ersten 22 Amin säuren des Aminoterminus bestimmt (Diese Methode des "micro-sequencing" ist beschrieben in: Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H. und Lottspeich, F.: A new siliconized fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. Eur. J. Biochem. 176 (1988) 509-519). Bei pC war eine direkte Ansequenzierung nicht möglich, da der N-Terminus einer Sequenzierung nicht direkt zugänglich ist, d. h. daß hier eventuell eine Myristilierung oder ähnliche Modifikationen vorliegen. Deshalb wurde dieses Protein trypisch gespalten, die Fragmente mittels HPLC aufgetrennt und zwei davon dann ansequenziert. Aus den so gewonnenen Aminosäure-Abfolgen wurden dann die nachfolgend aufgeführten Oligodesoxynukleotid-Sequenzen abgeleitet. Da meist mehrere Codon-Möglichkeiten für eine Aminosäure bestehen, mußten an den entsprechenden Stellen des Oligonukleotids auch die Basenvariationen berücksichtigt werden und während der Synthese in äquimolaren Verhältnissen eingebaut werden.

p100-p1 - p100 - Aminosäuren-Sequenz:

Glu Leu Asp Lys Glu Lys Leu Lys Asp Phe Val Asn Leu Asp Leu Glu Phe Val Asn Thr

p100 - Oligodesoxynukleotid-Sequenz, die in Klammern angegebenen und durch ":" getrennten Basen wurden während der Synthese (auf DNA Synthesizer) in äquimolaren Verhältnissen eingebaut;

GA(G;A) (C;T)T(G;T;A) GA(C;T) AA(G;A) GA(G;A) AA(G;A) (C;T)T(G;T;A) AA(G;A) GA(C;T) TT(C;T) GT(T;A) AA(C;T) (C;T)T(G;T;A) GA(C;T) (C;T)A(G;T;A) GA(G;A) TT(C;T) GT(T;A) AA(C;T) TA(C;T) A

pC - Aminosäuresequenzen:

p1: Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Thr Val Leu Ala Val Lys

p2: Asp Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys

pC-p1-Oligodesoxynukleotid-Sequenz:

AA(G;A) AT(T;A) AC(A;T) GA(T;C) (A;T)C(A;T) AA(T;C) GC(A;T) AC(A;T) GT(A;T) (T;C)T(G;A;T) GC(A;T) GT(A;T) AA(A;G) A

pC-p2-Oligodesoxynukleotid-Sequenz:

GA(T;C) (C;T)T(G;A;T) TT(T;C) GA(G;A) (T;A)C(A;T) GT(A;T) GA(G;A) GG(A;T;C) (T;C)T(G;A;T) (T;C)T(G;A;T) AA(A;G) A

## Beispiel 4

Reinigung der rekombinant produzierten *B. burgdorferi* Antigene am Beispiel des p41 (Flagellin)

Eine 50 ml Übernachtkultur des in Beispiel 2 beschriebenen Klons pUC8ly2 wurde in 1,5 ml frisches L-Broth Medium gegeben und bei 37°C und intensiven Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 wurde die Kultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für weitere 3 h inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (6000 rpm, 10 min), in 5 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,5 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 45 min in ein 37°C Wasserbad gegeben. Nach der Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 150 mM und Triton-X-100 in einer Endkonzentration von 1% wurde weiter für 45 min bei 37°C inkubiert, und die Suspension anschließend dreimal für je 5 min mit Ultraschall behandelt. unlösliche Bestandteile wurden bei 9000 rpm in 30 min pelletiert, in 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM Dithiothreitol und 1% Octyl-gluco-pyranosid resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Pelletierung unlöslicher Bestandteile bei 17 000 rpm in 30 min wurde der Überstand vorsichtig dekantiert.

Anschließend wurde das Pellet in 150 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Harnstoff, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol durch Rühren für 2 h suszeptiert. Auch hier unlösliche Bestandteile wurden erneut durch Zentrifugation bei 17 000 rpm in 30 min abgetrennt, und der Überstand auf eine DEAE-Sephadex-Säule mit einem Gelvolumen von 550 ml (3 cm Durchmesser, 80 cm Höhe) gepumpt. Die Elution des p41 Antigens erfolgte in einem NaCl-Gradienten von 0-800 mM in einem Gesamtvolumen von 600 ml. Das rekombinante p41 wird bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,25 M eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und weiter durch eine HPLC mit einer Mono Q Säule (Anionenaustauscher) aufgereinigt (Abb. 4). Ein Elutionsprofil mit dem gereinigten p41 in einem NaCl-Gradienten von 0-800 mM ist in Abb. 5 gezeigt. Die hier p41-positiven Fraktionen (nach Western Blot Analyse) wurden gegen 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol dialysiert und anschließend für die in Beispiel 5 gezeigten Tests verwendet. Aus einer Reinigung von p41 ausgehend von 1 l Bakterienkultur kann typischerweise eine Ausbeute von 5 bis 10 mg erwartet werden.

## Beispiel 5

Einsatz rekombinant produzierter *B. burgdorferi* Antigene (Beispiel p41) im ELISA

Bedingt durch die hohe Reinheit der produzierten rekombinanten Antigene sind *B. burgdorferi* spezifische Tests möglich, die maschinenlesbar und ohne großen technischen und personellen Aufwand durchführbar sind.

Mikrotiterplatten mit je 50  $\mu$ l des gereinigten p41 (Konzentration 0,5 - 5  $\mu$ g/ml) pro Napf beschichtet. Die Platten wurden nach Standardmethoden bei 4°C über Nacht inkubiert, gewaschen und die noch freien Bindungs-

## DE 39 42 728 C1

stellen 2%iger Rinderserum-Albumin-Lösung abgesättigt. Anschließend wurden jeweils 50 µl Serum (Verdünnung 1:200) dazupipettiert, für 2 h bei 37°C inkubiert, ungebundene Teile abgewaschen und die gebundenen Immunkomplexe mit je 50 µl Peroxidase-markiertem anti-human IgG (Verdünnung 1:1000) detektiert. Nach abermaligen Waschen wurden die Näpfe mit je 100 µl ortho-Phenyleniamin (Konzentration 0,1% in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 mit 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) als Farbbereagens beschickt und die im Dunkeln durchgeführte Färbung nach 10 min mit 100 µl 1 N Schwefelsäure gestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde in einem Photometer bei 486 nm ausgewertet (Abb. 6).

In dem hier gezeigten Beispiel wurden 7 positive und 8 negative anti-*B. burgdorferi* Seren ausgetestet. Von den klinisch gesicherten Lyme-positiven Seren waren drei, die auf Western Blot Streifen mit *B. burgdorferi* als Antigen keine Reaktion mit p41 zeigten, d. h. Seren aus dem Frühstadium der Infektion darstellten. Diese reagierten im ELISA mit dem rekombinanten Antigen ebenfalls nur grenzwertig. Normal p41-positive Seren dagegen reagierten sehr gut, während Lyme-negative Seren im Bereich von unter einer OD = 0,3 blieben.

## Beispiel 6

15 Herstellung *B. burgdorferi* spezifischer monoklonaler Antikörper

20 Weibliche Balb/c Mäuse wurden mit *B. burgdorferi* (DSM-Nr. 5662) intraperitoneal immunisiert. Die 1. Immunisierung erfolgte mit kompletten Freund'schen Adjuvans, 2-5 weitere Immunisierungen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans folgten im Abstand von 2 Wochen. 2 Wochen später wurde das Antigen ohne Adjuvans appliziert und 3 Tage später die Mäuse getötet und die Milz entfernt. Die Milz-Lymphozyten wurden mit Maus-Myelom-Zellen (Ag8-653) im Verhältnis 1:1 gemischt, sedimentiert und mit Fusionslösung (2,5 g Polyethylenglykol (PEG), 2,5 ml RPMI-Medium, 250 µl DMSO) versetzt: 1 min Zugabe der Fusionslösung, 90 sek. Inkubation bei 37°C. Die Zellen wurden erneut sedimentiert, das PEG entfernt und Kulturmedium (HAT-Medium) hinzugegeben. Schließlich wurde die Zellsuspension in Mikrotiterplatten, die Makrophagen als Feederzellen enthielten, ausgesät und bebrütet. Hybridoma-Überstände wurden unverdünnt im indirekten Immunfluoreszenz (IFT) getestet (Wilske, B.; Schierz, G.; Preac-Mursic, V.; Weber, K.; Pfister, H.-W.; Einhäupl, K. (1984): Serological diagnosis of Erythema migrans disease and related disorders. Infection, 12, 331-337).

25 IFT-positive Zellüberstände wurden mittels Western Blot analysiert. Im Western Blot reaktive Hybridomas wurden 4 mal mittels "limiting dilution" subkloniert und bezüglich ihrer Immunglobulin-Klasse und IgG-Subklasse identifiziert.

30 Auf diese Weise wurden folgende monoklonale Antikörper (MAB) erhalten:

## 1. MAB gegen p41:

35 (a) L41 1C11  
Dieser Antikörper war mit allen 30 getesteten *B. burgdorferi* Stämmen und mit Rückfallfieber Borrelien (außer *B. hermsii*), nicht jedoch mit Treponemen reaktiv.

(b) L41 1D3  
40 Dieser Antikörper war mit der Mehrzahl (21 von 24) der *B. burgdorferi* Stämme, nicht jedoch mit Rückfallfieber Borrelien und Treponemen reaktiv.

## 2. MAB gegen p100 (L100 1D4):

45 Dieser Antikörper war mit allen 30 getesteten *B. burgdorferi* Stämmen, nicht jedoch mit Rückfallfieber Borrelien oder Treponemen reaktiv.

## 3. MAB gegen pC (L22 1F8):

50 Dieser MAB war mit pC-Proteinen von Haut- und Liquorstämmen reaktiv, dagegen waren die pC-Proteine einiger, aber nicht aller Zeckenstämme negativ.

## 4. MAB gegen OspA:

55 OspA ist ein Hauptprotein (30 kD-Bereich) der äußeren Membran der meisten *B. burgdorferi* Stämme. OspA-Proteine europäischer *B. burgdorferi* Stämme sind antigenetisch heterogen und unterscheiden sich antigenetisch von den amerikanischen Stämmen. Die wenigen OspA-negativen Stämme haben pC-Proteine (Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Schierz, G.; Kühbeck, R.; Barbour, A. G.; Kramer, M. (1988): Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539, 126-143).

## (a) L32 2E7:

60 Insgesamt waren 29 von 32 Stämmen reaktiv. Die negativen Stämme wiesen kein OspA-Protein auf. Die 3 negativen Stämme waren mit dem pC-spezifischen MAB L22 1F8 reaktiv.

## (b) L32 1G3:

65 Dieser MAB war nur bei 3 von 25 getesteten Stämmen reaktiv. Die Kombination von MAB L32 2E7 und MAB L22 1F8 sowie die Reaktion mit MAB L100 1D4 erlaubt die Identifizierung von *B. burgdorferi* Borrelien und Treponemen. Eine sichere Identifizierung und Differenzierung von *B. burgdorferi* war mit bisher verfügbaren monoklonalen Antikörpern nicht möglich (Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Schierz, G.; Kühbeck, R.; Barbour, A. G.; Kramer, M. (1988): Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539, 126-143).

## 66 Beschreibung der Tabellen

## Tabelle 1

Reaktivität von Lyme-Borreliose-Seren aus verschiedenen Krankheitsstadien mit *B. burgdorferi*-Antigenen

## DE 39 42 728 C1

(p17, pC, p41, p100) im Western Blot mit *B. burgdorferi*-Lysat als Antigen

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die immunominanten Proteine in verschiedenen Stadien der Lymeborreliose.

1.1 Seren von gesunden Personen und in höherem Maße von Syphilispatienten wiesen Antikörper gegen p60 ("common antigen") auf. Seltener wurden Antikörper gegen p41 festgestellt.

1.2 Als immundominante Proteine erwiesen sich bei Frühmanifestationen (EM und LMR) das Flagella-Protein p41 und das pC-Protein. pC ist das immundominante Protein für die frühe Immunantwort. Insbesondere IgM-Antikörper gegen pC können früher auftreten als IgM-Antikörper gegen p41 (s. auch Abb. 2a)

1.3 Seren von Patienten mit Spätmanifestationen (ACA und Arthritis) reagierten in allen Fällen (n=22) mit p41 oder p100 und in 21 Fällen mit p100 oder p17. p17 war in 17, p100 in 19 und p41 in 20 Fällen reaktiv.

1.4 Die intrathetale IgG-Immunantwort war in allen 12 untersuchten Fällen gegen p41 gerichtet. Antikörper gegen p41 waren in 3 Fällen im Serum nicht nachweisbar.

Tabelle 2

Reaktivität von Immunseren (gegen verschiedene bakterielle Erreger) mit Proteinen von *B. burgdorferi* (Western Blot)

Western Blot-Streifen mit elektrophoretisch aufgetrenntem *B. burgdorferi*-Lysat wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt und mit Seren gegen verschiedene mehr oder weniger verwandte und deshalb kreuzreaktende Erreger inkubiert. Die Seren stammten von Kaninchen, die mit den jeweiligen Erregern immunisiert worden waren. Die geringste Kreuzreaktivität besitzt p100; nur eines (anti-*B. hermsii*) der getesteten 15 Erreger-spezifischen Seren reagiert mit diesem Protein. p41 und pC reagieren mit jeweils drei der Seren und scheinen deshalb auch noch geeignet für eine diagnostische Anwendung. Deutlich ist das Vorhandensein von immun-konservierten Antigenen zu erkennen; so reagieren zum Beispiel 14 bzw. 12 der getesteten Seren mit Proteinen der Größe 40 bzw. 60 kD (p40; p60). Diese "common antigens" sind deshalb ungeeignet für den diagnostischen Einsatz.

Tab. 1: Immundominante Proteine für die humorale Immunantwort bei Lyme Borreliose

## 1.1. Reaktivität von humanen Kontrollseren (IgG Western Blot)

	pC	p41	p60	Anzahl
Gesunde	—	2	3	17
Syphilis	—	1	5	9

## 1.2. Immunantwort gegen pC und p41 bei Erythema migrans (EM) und Lymphozytärer Meningoradikulitis (LMR) (Western Blot)

Diagnose	reaktive Proteine p41	pC	Ig Klasse	Anzahl
EM	11	13	IgM	15 <sup>1)</sup>
LMR	13	10	IgM	20 <sup>1)</sup>
	14	3	IgG	15 <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Die Seren waren im IgM-IFT-ABS Test positiv.<sup>2)</sup> Die Seren waren im IgG-IFT-ABS Test positiv.

## 1.3. Immunantwort gegen p100, p41 und p17 (IgG Western Blot)

Diagnose	p100	p41	p17	p100 od. p41	p100 od. p17	Anzahl
ACA	8	8	9	10	10	10
Arthritis	11	12	8	12	11	12

DE 39 42 728 C1

## 1.4. Intrathekale Immunantwort bei Lymphozytärer Meningoradikulitis (IgG Western Blot)

	lokale intrathekale Immunantwort	Reaktivität im Serum	Anzahl
5			
10	p41 12 andere Proteine 7	9 12	12 12
15			
20			
25			
30			
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			

DE 39 42 728 C1

Tabelle 2  
Reaktivität von Immunseren (gegen verschiedene bakterielle Erreger) mit Proteinen von *B. burgdorferi* (Western Blot)

Protein	<i>B. burgdorferi</i>	T. phage- densus	T. phage- densus	L. spip- poly- phasse	C. jejuni	E. coli	S. typhi- mrium	Sh. flex- uari	Y. ente- rocolit- ica 03	P. aero- ginosa	H. ente- rocolit- ica 03	N. me- tiastidis	L. mon- ocyt- otrophus	L. mi- cro- dys-	Cyto- genes 01	$\Sigma$	
p100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
p75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
p70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
p60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
p41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
p40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
OspB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
p33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
OspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
p10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
p23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
pC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
p21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6

## DE 39 42 728 C1

## Beschreibung der Abbildungen

## Abb. 1a und b

5 Reaktivität von *B. burgdorferi*-infizierten Patienten mit Lysaten von 5 verschiedenen *B. burgdorferi* Stämmen im Western Blot

Getestet wurden Seren der Stadien II und III (Neuroborreliose, Stadium II (IgM und IgG); Acrodermatitis (IgG) und Arthritis (IgG), Stadium III). Die frühe Immunantwort ist unabhängig vom Teststamm gegen ein enges Spektrum von Borrelienproteinen gerichtet (pC und p41). Die späte Immunantwort ist gegen ein breites Panel von Borrelienproteinen gerichtet. Immundominante Proteine sind (unabhängig vom Teststamm) p100 (mit variablen Molekulargewicht) und p41.

## Abb. 2

## 15 2a) Verlaufskontrolle (IgM-Western Blot) bei Erythema migrans

Das pC-Protein kann das immundominante Protein der frühen Immunantwort sein. Antikörper gegen p41 können später auftreten und nur schwach ausgeprägt sein. Bei längerer Krankheitsdauer können auch IgM-Antikörper gegen p17 auftreten.

## 20 2b) IgG-Western Blot bei Spätmanifestationen

25 IgG-Antikörper erkennen ein breites Spektrum von Borrelienproteinen. Bei Verwendung des Stammes PKo erwiesen sich als immundominante Proteine p17 und p100, p17 wird vom Stamm PKo stark ausgeprägt (im Gegensatz zu anderen Stämmen; siehe Abb. 1). Das Flagellin p41 wurde in 2 dieser Beispiele (Serum 1 und 2) nicht erkannt.

## Abb. 3

## 30 30 Schema der DNA-Amplifizierung der p41-kodierenden Region

A; Ausschnitt der *B. burgdorferi*-DNA mit der p41-kodierenden Region (schwarzer Balken).  
 B; Vergrößerung des 5' bzw. 3' Endes des p41-Gens mit den jeweiligen DNA-Sequenzen. Angegeben ist 35 zusätzlich der Translationsstart (ATG) sowie das Stop-Codon am 3'-Ende (TAA). Die für die PCR benutzten Primer-Sequenzen sind zusätzlich unter (Primer 1) bzw. über (Primer 2) dem p41 kodierende DNA-Doppelstrang angegeben. Eine Anhybridisierung der Primer kann nur mit den jeweiligen 3'-Bereichen erfolgen. Die 5'-Enden enthalten nicht-hybridisierende Teile, die Schnittstellen für Restriktions-Enzyme darstellen: GGATCC – BamHI; TCATGA – BspHI, am 5'-Ende; GACGTC – PstI am 3'-Ende.

## 40 Abb. 4

## 45 Expression, Reaktivität und Reinigung von rekombinantem p41

Linker Teil: coomassie-blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Die einzelnen Spuren waren wie folgt beladen:

- 1, *E. coli*-Lysat, negative Kontrolle;
- 2, *E. coli*-Lysat mit pUC8ly17 nach IPTG-Induktion, das rekombinant produzierte p41 ist als zusätzliche Bande im Bereich von ca. 45 kDa zu erkennen;
- 3, Überstand des Lysats aus 2 nach Aufbrechen der Zellen wie in Beispiel 4 beschrieben;
- 4, Pellet-Fraktion der lysierten Zellen mit dem rekombinanten p41;
- 5, Octyl-gluco-pyranosid Überstand;
- 6, wie 5, jedoch Pellet-Fraktion;
- 7 – 10, Fraktionen nach Elution von p41 von einer MonoQ-Säule durch einen Salzgradienten;
- Spuren 9 und 10 enthalten rekombinantes p41,

bedingt durch Degradationserscheinungen sowie unvollständige Translation treten neben dem vollständigen Produkt noch kleine Fragmente auf, die sich jedoch auch in authentischen p41-Material aus *B. burgdorferi* finden lassen.

60 rechter Teil: Immun-gefärbter Western Blot eines SDS-Geles mit Proben des Coomassie-gefärbten Gels. Die Immunfärbung wurde mit einem in Beispiel 6 beschriebenen monoklonalen Antikörper durchgeführt. Bezeichnung der Spuren bzw. der Proben wie Coomassie-gefärbtes Gel; Spur 0, Leerspur.

## Abb. 5

## 65 HPLC-Elutionsprofil von p41 aus einer Ionenaustauscher-Säule mit einem Salzgradient

Im Anschluß an die Anionenaustauscher-Reinigung (MonoQ) von p41 wurde das Antigen gegen 4M Harnstoff

## DE 39 42 728 C1

ohne Salz zurückdialysiert und wiederum auf die MonoQ-Säule gegeben, um die Reinheit zu überprüfen. Das Elutionsprofil zeigt nur noch einen Proteinadsorptionsgipfel. Der kleinere Gipfel unmittelbar vor dem Hauptanteil entspricht dem in Abb. 4, Spur 8 sichtbaren p41-Fragment mit einer Größe von ca. 30 kD (getestet durch Western Blot).

Abb. 6

## IgG-ELISA mit rekombinantem p41 als Antigen

Das über Anionenaustauscher (MonoQ) gereinigte rekombinante Antigen (s. Abb. 5) wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Es wurden 7 Seren von Patienten mit einer klinisch definierten Lyme-Borreliose und 8 Seren von Gesunden getestet. 4 Seren der Lyme-Borreliose Patienten waren im Western Blot stark reaktiv mit dem rekombinanten p41 (= positiv), 3 Seren schwach reaktiv (= grenzwertig), die Seren der Gesunden reagierten nicht (= negativ). Der IgG-ELISA zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Y-Achse: Optische Dichte bei Wellenlänge 486 nm: grenzw. = grenzwertig

Abb. 7

Reaktivität von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene *B. burgdorferi* Antigene

Sechs monoklonale Antikörper gegen *B. burgdorferi* wurden mit 30 verschiedenen *B. burgdorferi*-Stämmen, 4 Rückfallfieberborrelii-Stämmen und 2 verschiedenen Treponemen getestet. In der Abbildung sind drei verschiedene *B. burgdorferi* Isolate (1 = B31, amerikan. Stamm; 2 = PKo, deutscher Hautstamm; 3 = PBI, deutscher Liquorstamm), eine Rückfallfieberborrelle (4 = *B. hermsii*) und ein Treponemenstamm (5 = *T. phagedenis*) exemplarisch dargestellt. Es wurden die gemäß Beispiel 6 hergestellten monoklonalen Antikörper eingesetzt.

## Patentansprüche

1. Immunologisch aktives Protein von *Borrelia burgdorferi*, das in einer von anderen *Borrelia burgdorferi* stammenden Proteinen freien Form vorliegt und gentechnologisch unter Verwendung von aus *Borrelia burgdorferi* (DSM-Nr. 5662) isolierter DNA hergestellt ist. 20
2. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 41 kDa aufweist.
3. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 22 kDa aufweist.
4. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäure-Partialsequenz Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Thr Val Leu Ala Val Lys und/oder Asp Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys aufweist. 35
5. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 17 kDa aufweist.
6. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufweist.
7. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäure-Partialsequenz Glu Leu Asp Lys Glu Lys Leu Lys Asp Phe Val Asn Leu Asp Leu Glu Phe Val Asn Thr aufweist. 45
8. Monoklonale Antikörper die gegen eines der immunologisch aktiven Proteine nach einem der Ansprüche 1 bis 7 gerichtet sind.
9. Verwendung von immunologisch aktivem Protein nach einem der Ansprüche 1-7 zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia*-Stämme, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 7 verwendet wird, das mit den in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen Antikörpern reagieren kann und, daß wenigstens eine Anzeigekomponente eingesetzt wird, die den Nachweis von Komplexen aus immunologisch aktivem Protein und Antikörper ermöglicht. 50
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß 2 bis 4 immunologisch aktive Proteine nach den Ansprüchen 1 bis 7 verwendet werden.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzeigekomponente ein gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichteter Antikörper ist, der eine Markierung aufweist.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung in einem radioaktiven Isotop besteht. 55
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung aus einem Enzym besteht, das eine Farbreaktion katalysieren kann.
14. Verwendung nach den Ansprüchen 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das immunologisch aktive Protein oder ein dagegen gerichteter monoklonaler Antikörper biotinyliert ist und die Anzeigekomponente Avidin oder Streptavidin mit daran kovalent gebundenem Enzym, insbesondere Peroxydase ist. 60
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form eines ELISA-Testkit durchgeführt wird.
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 7 an Mikrotiterplatten gekoppelt ist und die Anzeigekomponente aus Anti-human-Immunoglobulin, insbesondere IgG- und/oder IgM-Antikörpern besteht, an die ein eine 65

## DE 39 42 728 C1

Farbreaktion katalysierendes Enzym gekoppelt ist.

17. Verwendung von immunologisch aktiven Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung von Impfstoffen zum Schutz gegen Infektionen von Borrelia-Bakterien, vorzugsweise Borrelia burgdorferi-Stämmen.

5

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

20.NOV.1998 10:39

OCTROOIBUREAU 31 70 3527528

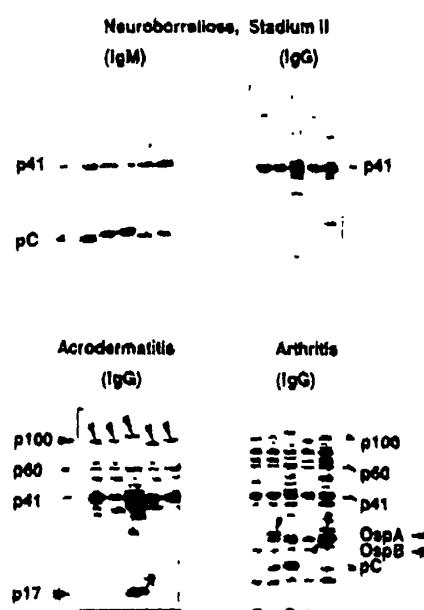
NO.418 P.18/27

- Leerselte -

## ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer: DE 39 42 728 C1  
Int. Cl. 5: C 07 K 15/04  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

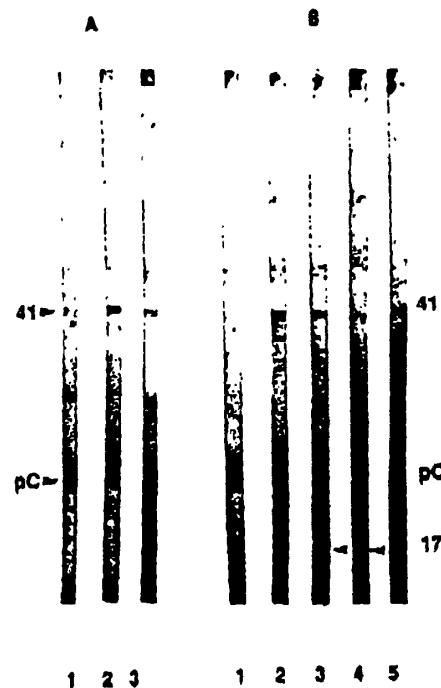
Abb. 1: IgG Western Blot mit 5 verschiedenen Stämmen als Antigen  
**IgG und IgM-Antwort im Stadium II**  
**IgG-Antwort im Stadium III**



## ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer: DE 39 42 728 C1  
 Int. Cl. 5: C 07 K 15/04  
 Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 2a: IgM Western Blot bei Erythema migrans  
 Antigen: B. burgdorferi / Stamm PKe



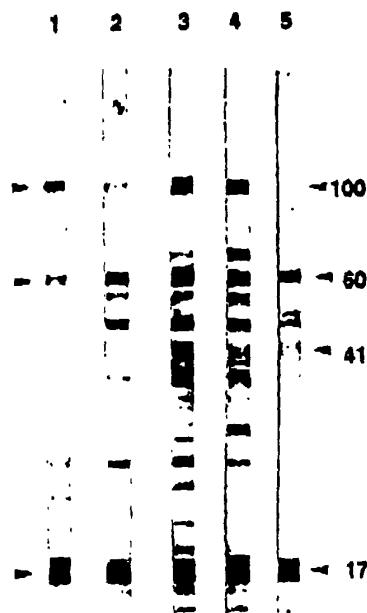
Patient A: 1 Erstuntersuchung  
 2, 3 Verlaufskontrolle nach 1 und 3 Wochen

Patient B: 1 Erstuntersuchung  
 2-5 Verlaufskontrollen nach 2, 9, 10 und 11 Wochen

ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer: DE 39 42 728 C1  
Int. Cl. 5: C 07 K 18/04  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 2b: IgG-Western Blot bei Spätmanifestationen  
Antigen: *B. burgdorferi* / Stamm PKo

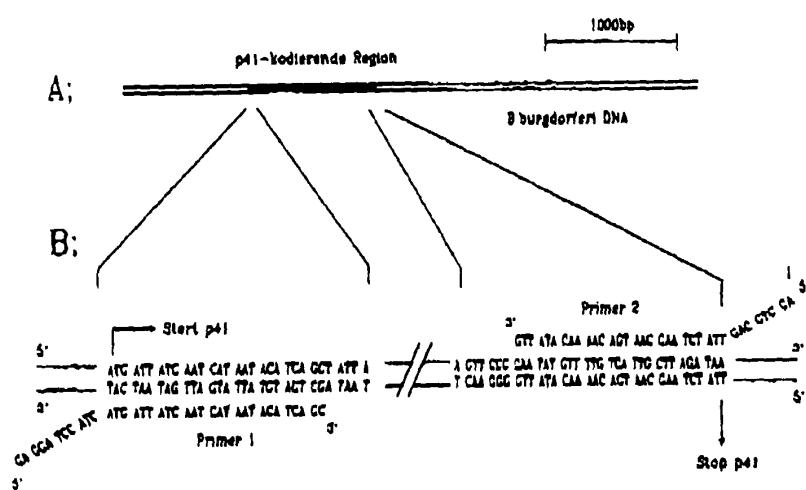


1, 2, 3      **Acrodermatitis**  
4, 5      **Arthritis**

ZEICHNUNGEN SEITE 4

Nummer: DE 39 42 728 C1  
 Int. Cl. 9: C 07 K 16/04  
 Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 3



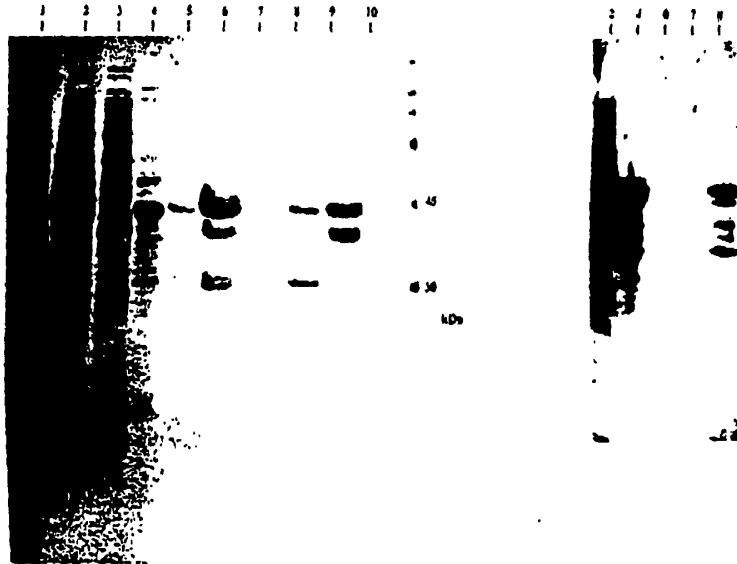
20. NOV. 1998 10:40

OCTROOIBUREAU 31 70 3527528

NO.418 P.23/27

**ZEICHNUNGEN SEITE 5**

Nummer: DE 39 42 729 C1  
Int. Cl. 5;  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991



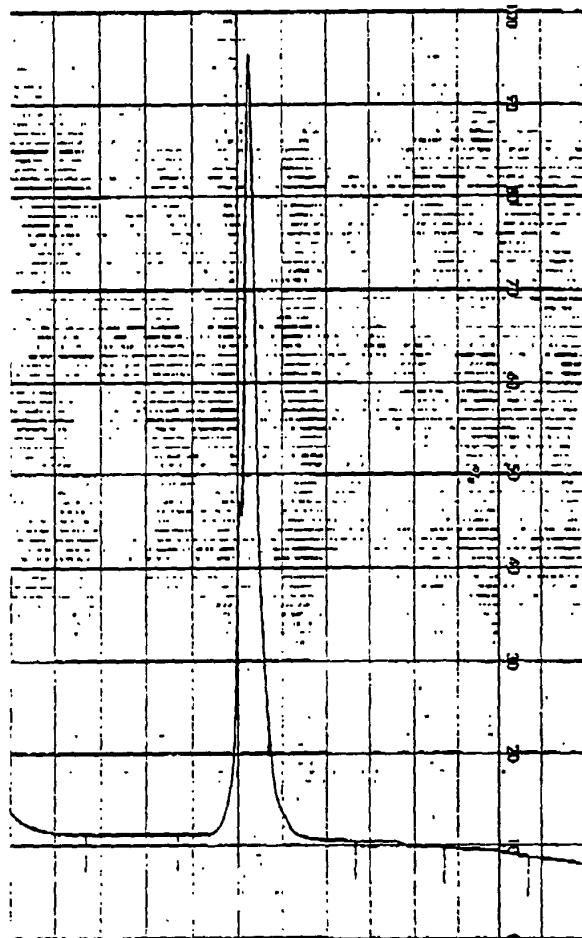
108 121/331

ZEICHNUNGEN SEITE 6

Nummer: DE 39 42 728 C1  
Int. Cl. 6: C 07 K 15/04  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 5

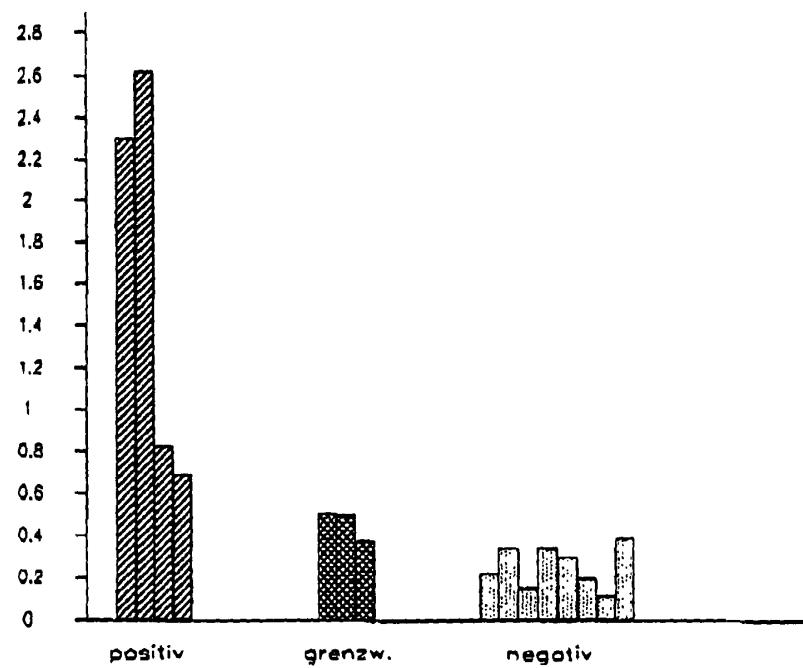
Stationsprofil von p11 aus einer Tauschtauscher-Säule



ZEICHNUNGEN SEITE 7

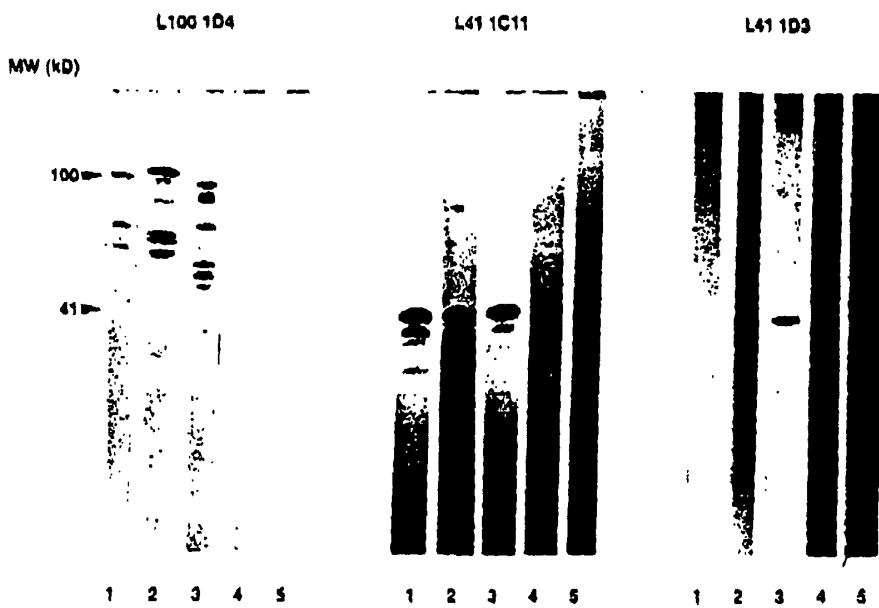
Nummer: DE 39 42 728 C1  
Int. Cl. 5: C 07 K 15/04  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 6

IgG - ELISA mit rekombinantem p41 als Antigen (0.5 $\mu$ g/ml)

ZEICHNUNGEN SEITE 8

Nummer: DE 39 42 728 C1  
Int. Cl. 5: C 07 K 18/04  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 7a: Monoklonale Antikörper gegen *B. burgdorferi*

ZEICHNUNGEN SEITE 9

Nummer: DE 39 42 728 C1  
Int. Cl. 5: C 07 K 15/04  
Veröffentlichungstag: 23. Mai 1991

Abb. 7b: Monoklonale Antikörper gegen *B. burgdorferi*